

ESTUDOS SÔBRE A DISTRIBUIÇÃO DO RADIOZINCO NO TOMATEIRO (*Lycopersicum esculentum*)

E. MALAVOLTA

Livre Docente de Química Agrícola
E. S. .A “Luiz de Queiroz”, U. S. P.

D. PELLEGRINO

Assistente de Química Analítica
E. S. A. “Luiz de Queiroz”, U. S. P.

ÍNDICE

1 — Introdução	78
2 — Material e Métodos	79
3 — Resultados e Discussão	81
4 — Resumo e Conclusões	83
5 — Summary	83
6 — Literatura Citada	84

1 — INTRODUÇÃO

1.1. *Generalidades.* Com a descoberta da radioatividade induzida em 1932 à qual se seguiu, poucos anos depois, a invenção do ciclotron, um novo instrumento de pesquisa foi pôsto à disposição de quem se interessasse pela química dos sistemas biológicos.

Os isótopos radiativos têm a sua possibilidade de aplicação baseada no fato de se comportarem quimicamente de modo idêntico aos seus "irmãos" inertes. Graças à instabilidade do núcleo que emite radiações diversas — materiais ou não — é possível, com o auxílio de aparelhos adequados ou filme de raios X, acompanhar a sua marcha no organismo animal ou na planta; tem-se, ainda, simultaneamente, indicação da localização do isótopo inerte que foi absorvido indistintamente.

Os contadores Geiger-Muller são usados para detectar as radiações emitidas, possuindo um alto grau de sensibilidade. Assim, por exemplo, a energia irradiada durante a transformação espontânea de um único átomo radioativo inicia uma avalanche de descargas no tubo Geiger-Muller. Os impulsos criados dessa maneira podem ser registrados mecânicamente o que dá a medida da quantidade de radioelemento presente. Um contador é capaz de fazer medições satisfatórias de 10⁻⁷ milicuries, podendo por isso ser usado para medir a radioatividade de 10⁻⁷ gramas de um elemento "marcado" que tenha a atividade específica de 1 milicurie por grama.

Um curie de qualquer material radioativo é a quantidade do elemento que possui uma atividade igual à de uma grama de rádio, ou seja, a quantidade que sofre, na unidade de tempo, o mesmo número de desintegrações. Nessa base 1 curie equivale a 3,7 x 10¹⁰ desintegrações por segundo.

Positrons, partículas beta e raios gama emitidos pelos radioelementos ativam chapas fotográficas. Folhas intactas ou secções de órgãos contendo material radioativo se colocados em contacto com filme fotográfico produzirão uma imagem que indica a distribuição do elemento no tecido considerado. A técnica descrita — radioautografia — foi usada pela primeira vez por STOUT (1939).

1.2. *O problema.* Os experimentos de que trata a presente contribuição foram iniciados em 1952 no Department of Plant Nutrition, University of California, Berkeley, Calif., U. S. A. Foram depois continuados em Piracicaba graças ao auxílio prestado pelo Laboratório de Isótopos da U. S. P. fornecendo o Zn⁶⁵ necessário para os ensaios e pondo à disposição um "scaler" da marca Panax e os tubos G-M.

As finalidades do trabalho: verificar se o zinco pode se translocar dos órgãos mais velhos para os mais novos quando o fornecimento desse micronutriente à planta pára de ser feito; verificar a intensidade de translocação do zinco quando aplicado às raízes e nas fôlhas; verificar a distribuição do zinco nos diversos órgãos de "seedlings" — êste último ponto nos foi sugerido por Dr. R. ROSSITER; êle estava muito interessado na forma de distribuição do zinco nas plantas porque havia verificado na Australia que, plantas colhidas no campo mostraram ter várias centenas de partes por milhão de Zn nas raízes enquanto na folhagem havia sintomas de carência desse elemento; aquele autor não sabia se a alta concentração de Zn nas raízes era simplesmente devida à contaminação ou se resultava de algum aspecto da fisiologia do zinco na planta.

O zinco radioativo que tem uma meia vida de 250 dias (meia vida é o período no fim do qual a atividade do radioelemento se reduz à metade; a seguir, em um outro período igual, o material perde metade da atividade remanescente e assim por diante) é muito útil nos estudos de absorção e translocação desse micronutriente por causa da sua longa meia vida e da facilidade de detecção das suas bastante energéticas radiações gama.

No decorrer dos ensaios em questão, apareceram alguns resultados interessantes que já foram relatados (MALAVOLTA e CARLTON, 1953).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Obtenção do $Zn^{65}Cl_2$* . O zinco radioativo usado nos ensaios em Berkeley foi obtido no ciclotron bombardeando cobre com deuteron. A superfície das placas de cobre bombardeadas foi tratada cuidadosamente com HNO_3 que dissolveu uma tênue camada. A solução foi evaporada até secar, retomada em HCl 0,3 N, sendo a seguir o cobre precipitado com H_2S e o sulfeto separado por filtração. A solução foi evaporada a séco, o resíduo retomado em HCl 0,3 N e o cobre em solução precipitado com H_2S . Isto se repetiu até que não houvesse mais formação de precipitado de sulfeto. Evaporou-se, então, a solução até secar; o resíduo foi a seguir retomado em HCl 0,1 N e transferido para um funil de separação. A atividade foi extraída com ditizona a 0,05 por cento depois de se fazer a fase aquosa ligeiramente amoniacal com algumas gotas de NH_4OH . Finalmente o zinco foi extraído da solução de ditizona com HCl 0,05 N. Obteve-se assim uma solução de $Zn^{65}Cl_2$ praticamente "carrier free", isto é, isenta de zinco inerte.

2.2. *Radioautografia com Zn⁶⁵*. A técnica seguida foi uma ligeira modificação da técnica original de ARNON et al. (1940) e STOUT et al. (1947). O material a ser radioautografado — fôlhas ou "seedlings" — era colhido pela manhã; no caso dos "seedlings" as raízes eram lavadas em água destilada e depois em HCl diluído e a seguir secas entre fôlhas de papel absorvente. Depois colava-se com fita adesiva o material numa fôlha de papel de estanho muito fina; abaixo desta e sôbre o material punha-se uma fôlha de papel bastante fino; sob a fôlha colocada em baixo da lâmina de estanho era colocado o filme de raios X (No screen X-Ray film, fabricado pela Eastman Kodak, Rochester, N. Y., U.S.A.); abaixo do filme e sôbre a fôlha de papel fino cobrindo o material, punha-se fôlhas de papelão grosso; a seguir tudo era pôsto entre lâminas pesadas de ferro independentes mas mantidas unidas graças a braçadeiras com parafusos; o conjunto era então envolto em papel negro, grosso, e colocado na geladeira durante todo o tempo de exposição. Tôdas as operações efetuadas a partir da introdução do filme de raios X têm que ser, evidentemente, feitas na câmara escura. Para o caso do radiozinco, o trabalho anterior (MALAVOLTA e CARLTON, 1953) havia indicado que 10⁶ contagem/cm² eram suficientes para se obter um bom radioautógrafo. Fimdo o período de exposição, o material era levado à câmara escura onde se fazia a revelação e a fixação do filme pelos processos usuais (ver H. C. P., pp. 2116 e 2119).

2.3. *Cultivo das plantas e aplicação do Zn⁶⁵*. Para estudar a distribuição do zinco radioativo nos "seedlings" de tomateiro, êstes depois de atingir 1 semana de idade foram transferidos para solução nutritiva completa na qual se adicionou 0,2 microcuries de radiozinco. Duas semanas depois as plantinhas foram retiradas para se fazer o radioautógrafo.

O estudo da translocação do radiozinco foi feito antes qualitativamente e depois em bases quantitativas. No primeiro caso as plantas foram cultivadas em solução nutritiva completa à qual além de zinco inerte — através duma solução suplementar contendo os micronutrientes — foi fornecido Zn⁶⁵Cl₂ em doses semanais que, depois de quatro semanas, totalizavam 0,5 microcuries. Passou-se então a não fornecer mais zinco algum às plantas, tendo sido etiquetadas tôdas as fôlhas já formadas. Três semanas depois de ter cessada a adição tanto do zinco inerte como a do radioativo, foram colhidas fôlhas novas — formadas nesse tempo — e radioautografadas. Para verificar quantitativamente a translocação do radiozinco, dois procedimentos diversos foram usados. Em um deles a técnica foi seme-

lhante à descrita para o ensaio qualitativo; somente que, em lugar de radioautógrafos, fez-se contagens (ver 2.4.). No outro, o zinco radioativo foi pincelado nas duas faces das folhas mais velhas; duas semanas depois dessa operação — período em que as plantas não receberam zinco algum na solução nutritiva — as folhas mais novas foram colhidas para as contagens.

2.4. *Contagens.* O material foi preparado para as contagens da maneira seguinte: colocado em cápsulas de porcelana — tendo sido feitas previamente as pesagens dos diversos órgãos — levadas ao forno cuja temperatura subia gradualmente até 550°C. Obtidas as cinzas estas eram retomadas em HCl 1 + 9. Alíquotas adequadas eram pipetadas para “planchets” de aço inoxidável e posta sob lâmpadas infravermelha até secar. A seguir se fazia as contagens usando-se um tubo Geiger Muller com janela de alumínio pesando 7 mg/cm².

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Distribuição do radiozinc em “seedlings” de tomate.* O radioautógrafo dado a seguir (Fig. 1) mostra a maneira pela qual o radiozinc se distribuiu na plantinha de tomate. Vê-se que há um acúmulo considerável do material nas raízes, no caule novo e nos pontos de crescimento; as folhas compostas recém formadas se mostram bastante ativas e até mesmo nas folhas cotiledonares há alguma atividade. É visível, porém, ser a concentração de Zn⁶⁵ muito maior no sistema radicular do que na parte aérea. Com relação a esse ponto é interessante mencionar duas coisas: quantitativamente, a maneira pela qual o zinco se distribui no tomateiro é idêntica à distribuição do ferro no feijoeiro (REDISKE and BIDDULPH, 1953); a acumulação nas raízes pode representar uma alta porcentagem do zinco adicionado originalmente à solução; em segundo lugar os resultados em discussão mostram, ou pelo menos sugerem, que, provavelmente ROSSITER (1953) não se achava em presença de material contaminado por zinco no sistema radicular; a alta concentração desse micronutriente é consequência duma necessidade fisiológica sobre cujo significado não se especulará aqui. No caso presente fica afastada a possibilidade de se tratar de zinco adsorvido ou retido mecânicamente na superfície das raízes uma vez que as lavagens com água destilada e ácido clorídrico diluído são capazes de limpar completamente a superfície das raízes.

3.2. *Translocação do radiozinc.* Veja-se em primeiro lugar a demonstração qualitativa da translocação que é apresentada na Fig. 2. A Fig. 2 é um radioautógrafo obtido de folhas que se

formaram 3 semanas depois de ter cessado a adição de $Zn^{65}Cl_2$ à solução nutritiva. Todo o zinco que aí se encontra deve ter se originado, portanto, dos órgãos mais velhos.

As relações quantitativas sôbre a translocação se acham resumidas nas tabelas seguintes :

TABELA I
Translocação do Zn^{65} fornecido na solução nutritiva

Parte da planta	ctgs/min./grama	Atividade encontrada em % ativ. fornecida
Fôlhas velhas (*)	40	3.0
Fôlhas novas	20	1.6
Caule velho (*)	92	7.9
Caule novo	36	1.3
Raízes	80.3	52.8

(*) formados antes de cessar a adição de radiozinco à solução nutritiva.

Os dados do outro ensaio vêm a seguir :

TABELA II
Translocação do Zn^{65} pincelado nas fôlhas

Parte da planta	ctgs/min./grama	Atividade encontrada em % ativ. fornecida
Fôlhas pinceladas	132	10.5
Fôlhas já formadas na ocasião	10	3.0
Fôlhas novas	7	3.5
Caule até altura das fôlhas pinceladas	9	6.1
Caule novo	2	0.5
Raízes	2	1.0

As duas tabelas dadas atrás são autoexplicativas; mostram que, quaisquer que sejam as técnicas empregadas, o zinco se transloca. Em função das quantidades de zinco radioativo empregadas diga-se em resumo o seguinte : comparando-se os fornecimentos às raízes e às fôlhas, a absorção pelas primeiras é mais intensa — 66,6 por cento contra 24,2 por cento da atividade fornecida; entretanto, no primeiro caso a translocação foi de apenas 5,6 por cento, enquanto das fôlhas 13,7 por cento do Zn^{65} absorvido foi translocado; em outras palavras, fornecendo-se zinco na solução nutritiva, mais de 90 por cento permanece fixo nas raízes, pelo menos durante as cinco primeiras semanas.

4 — RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho são descritos alguns ensaios feitos para estudar a distribuição do radiozinco por "seedlings" de tomateiro e para verificar a translocação desse micronutriente em plantas adultas.

4.1. "Seedlings" de tomateiro cultivados em solução nutritiva receberam durante duas semanas 0,2 microcuries de Zn^{65} na forma de cloreto; depois desse período as plantinhas foram colhidas e após lavagem cuidadosa das raízes com água destilada e HCl diluído, fez-se um radioautógrafo (Fig. 1). O radioautógrafo mostrou que o "seedling" inteiro, inclusive as folhas cotiledonares estavam ativas; o Zn^{65} se concentra, porém, de preferência nas raízes; êste fato sugere que a alta concentração de zinco encontrado por ROSSITER (1953) nas raízes de plantas cultivadas em condições naturais não resulta de contaminação sendo uma expressão da fisiologia desse micronutriente.

4.2. A translocação do radiozinco foi estudada de três modos diferentes. No primeiro caso se forneceu $Zn^{65}Cl_2$ na solução nutritiva durante quatro semanas; três semanas depois que a adição parára, tomou-se um radioautógrafo (Fig. 2) de folhas nascidas nesse período; a atividade nelas encontrada mostra que houve translocação das folhas mais velhas para as mais novas. No segundo ensaio procedeu-se de maneira semelhante, porém, em vez de radioautógrafo fez-se contagens nas diversas partes das plantas; foi verificado então que 66,6 por cento da atividade fornecida fôra absorvida; entretanto apenas 5,6 por cento se translocou para os órgãos mais novos. No último experimento, o $Zn^{65}Cl_2$ foi aplicado diretamente às folhas; três semanas depois mediu-se atividade em tôdas as partes da planta notando-se que : 24,2 por cento do Zn^{65} aplicado foi absorvido; 13,7 por cento se translocou para o resto da planta, incluindo-se as raízes.

5 — SUMMARY

The present paper relates a few experiments carried out to study the distribution of radiozinc in tomato seedlings as well its translocation in adult plants.

5.1 Tomato seedlings grown in nutrient solution were given during two weeks ca. 0.2 microcuries of $Zn^{65}Cl_2$; the seedlings were then harvested, and after careful washing of the roots with distilled water and diluted HCl, a radioautograph was taken (Fig. 1); this shows that the whole seedling, including the first cotyledon leaves are active; the Zn^{65} is preferentially concentrated, however, in the root system; this fact suggests that finding by ROSSITER (1953) that the roots of plants

growing under natural conditions had a very high concentration of zinc is not due to soil contamination being ascribable to the physiology of such micronutrient.

5.2. The translocation of radiozinc was demonstrated by three different ways. In the first case, $Zn^{65}Cl_2$ was supplied to the nutrient solution during four weeks; three weeks after the addition of the radiozinc was discontinued, the newer leaves were detached and a radioautograph was taken (Fig. 2); the activity therein found shows that translocation occurred from the old leaves to the young ones. In the next experiment, identical procedure was followed but, instead of a radioautograph, different parts of the plant were ashed and counted; it was verified that 66.6 per cent of the activity supplied was absorbed; due to a great fixation within the roots only 5.6 per cent was translocated to the newer organs. In the third trial, $Zn^{65}Cl_2$ was directly applied to both upper and lower surfaces of medium aged leaves; counting the separated organs revealed that: 24.2 per cent of the activity applied had been absorbed; however, 13.7 per cent translocated to the rest of the plant including to the roots.

The author wishes to express his gratitude to Dr. P. R. Stout, Chairman, Dept. of Plant Nutrition, University of California, Berkeley and to Mr. A. B. Carlton for their help during part of this work.

O autor agradece ao Laboratório de Isótopos da Universidade de São Paulo, na pessoa do Dr. T. Eston, o fornecimento do Zn^{65} usado neste trabalho.

6 — LITERATURA CITADA

- ARNON, D. I., P. R. STOUT, and F. SIPOS. 1940 Radioactive phosphorus as an indicator of phosphorus absorption of tomato fruits at various stages of development. *Amer. Jour. Bot.* 27: 791-798.
- HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS. 1939 23rd edition, Chemical Rubber Publ. Co., Cleveland, Ohio.
- MALAVOLTA, E. e A. B. CARLTON. 1953 Nota preliminar sobre a distribuição do radiozinc no tomateiro. *An. E S. A. "Luiz de Queiroz"* (Piracicaba). Em impressão.
- REDISKE, J. H. and O BIDDULPH. 1953 The absorption and translocatin of iron. *Plant Physiol.* 28: 576-593.
- ROSSITER, R. C. 1953 Comunicação particular.
- STOUT, P. R. 1939 Comunicação particular.
- STOUT, P. R., R. OVERSTREET, L. JACOBSON and A. UL-RICH. 1947 The use of radioactive tracers in plant nutrition studies. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 12: 91-97.

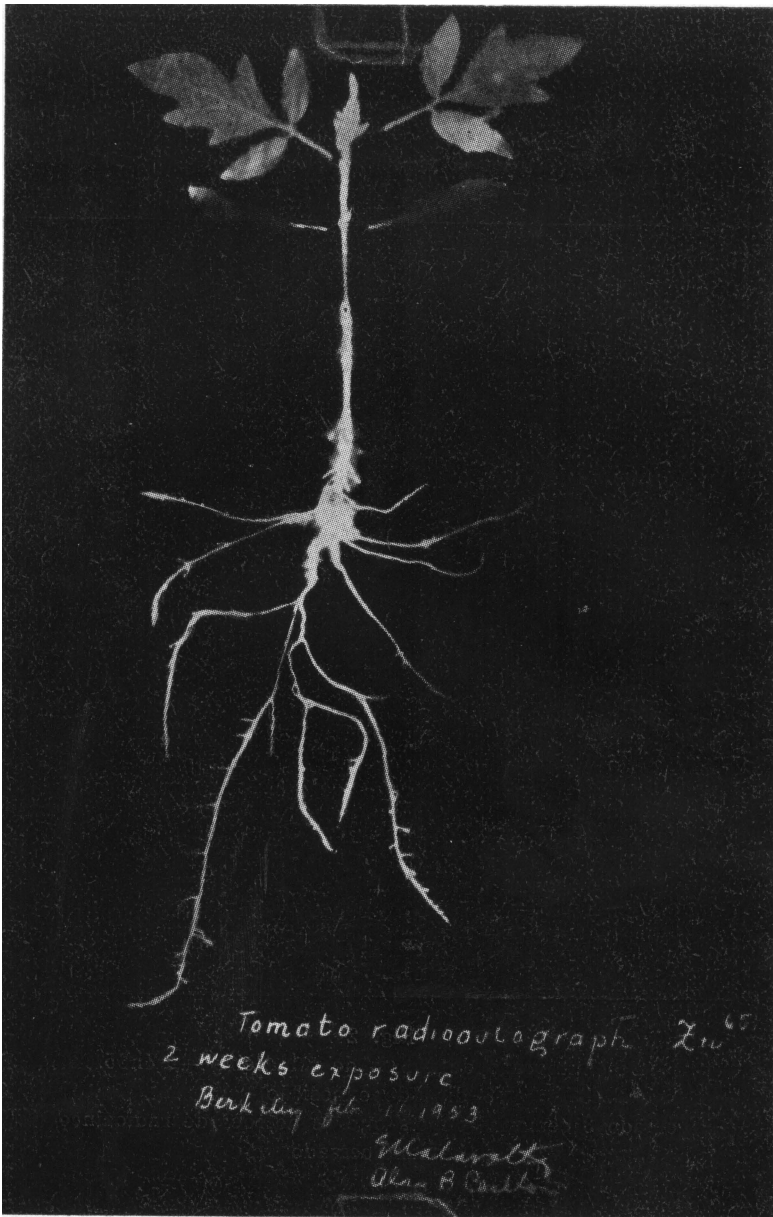


Fig. 1
Radioautógrafo de tomateiro — Zn65
2 semanas de exposição

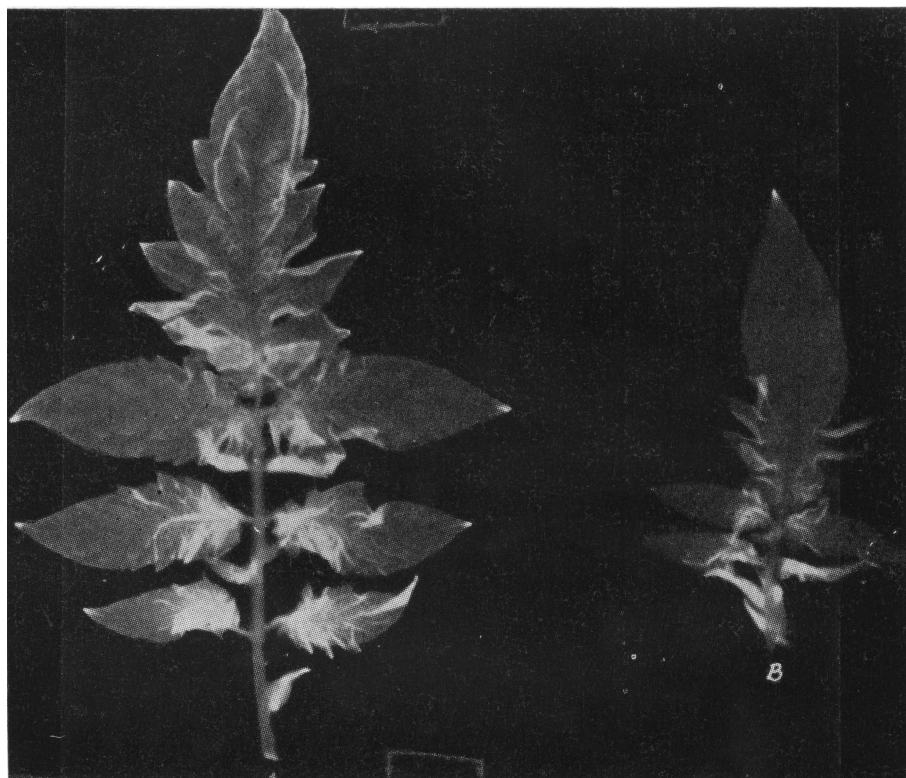


Fig. 2
Radioautógrafo de fôlhas de tomateiro — Zn65
8 dias de exposição
Tomado 3 semanas depois que as adições de radiozinco
havam cessado